

**Zytogenetische Untersuchungen an einer
unausgelesenen Serie von Neugeborenen-
auf X-Chromatin**

Modellstudie zur Entwicklung einer Screeningmethode

Gilbert Weidmann

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0003

Aus der I. Frauenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. J. Zander

Zytogenetische Untersuchungen an einer unausgelesenen
Serie von Neugeborenen auf X-Chromatin .
Modellstudie zur Entwicklung einer Screeningmethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gilbert Weidmann

aus

Füssen

1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Zander

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J.-D. Murken

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. August 1980



Inhaltsübersicht

I Einleitung

II Allgemeine Problematik

1. Definition und Theorien des Barrschen Körperchens
2. Untersuchungsmaterialien
3. Färbungen

III Eigene Untersuchungen

1. Material und Methode
 - a) Gewinnung des Materials
 - b) Färbung
2. Auswertung
3. Ergebnisse
 - a) Geschlechtsbestimmung mit Hilfe des X-Chromatins
 - b) Vergleich der X-Chromatin-Befunde mit dem Ergebnis der Y-Fluoreszenz und klinischen Angaben
 - c) Versuche über die Möglichkeit und Dauer einer Konservierung von Eihautpräparaten

IV Diskussion

1. Material
 - a) Wangenabstrich
 - b) Eihaut
2. Ergebnisse
 - a) Frequenz von X-Chromatin und Gonosomenaberrationen
 - b) Fehlerquote und Verlässlichkeit
3. Vorschlag zur Screeningmethode

V Zusammenfassung

VI Literaturverzeichnis

I Einleitung

Hinter phänotypisch weitgehend unauffälligen Individuen können sich gonosomale Aberrationen verbergen und sich damit der frühzeitigen klinischen Diagnose im Neugeborenenalter entziehen. Auch bei verschiedenen Formen des Hermaphroditismus (wie gemischte Gonadendysgenese, Adrenogenitales Syndrom, transplazentare Virilisierung, testikuläre Feminisierung) muß das äußerlich sichtbare Geschlecht mit dem Kerngeschlecht nicht übereinstimmen (PRADER, 42). So wurden von LUBS (31) in einer großangelegten Studie (4500 Fälle) nur ein Viertel der Aberrationen allein durch phänotypische Kriterien entdeckt.

Zur Kerngeschlechtsbestimmung und Aufdeckung pathologischer Gonosomenmuster stehen uns neben der Chromosomenanalyse die einfacheren Methoden der Bestimmung von X- und Y-Chromosomen zur Verfügung. Nur die letzteren lassen sich zu leicht praktikablen Untersuchungsverfahren entwickeln, mit deren Hilfe alle pathologischen Fälle unter der großen Zahl gesunder Neugeborener in Breitenuntersuchungen (Screening) herausgefunden werden können.

Als BARR und BERTRAM (4) 1949 das sog. Barrsche Körperchen (X-Chromatin) in weiblichen Zellen entdeckten, war eine elegante Methode geschaffen, die Rückschlüsse auf das Kerngeschlecht und einen Teil der evtl. vorhandenen Gonosomenaberrationen zuließ. Sind im menschlichen Interphasekern 2 X-Chromosomen vorhanden (z.B. $q = 46/XX$), so färbt sich mit verschiedenen Färbemethoden das 2. X-Chromosom intensiv im Gegensatz zum Euchromatin an, wobei es als eine, die Kernmembran berührende, runde bis ovaläre Chromatin-Verdichtung bestimmter Größe erscheint.

Seit 1969 läßt sich auch das Y-Chromosom als fluoreszierendes Teilchen im Interphasekern mit Hilfe des UV-Mikroskops darstellen. Durch gleichzeitige Bestimmung von X-Chromatin und Y-Fluoreszenz können wir das Kerngeschlecht in den meisten Fällen angeben - zur Sicherung der Diagnose ist die Chromosomenanalyse ergänzend heranzuziehen.

Voraussetzung für die breite Anwendung einer Untersuchung ist die leichte Gewinnbarkeit des Materials. Diesem Anspruch genügen sowohl Eihaut als auch Wangenabstrich, die beide als leicht zugängliches Untersuchungsmaterial seit Jahren zur X-Chromatinfärbung verwendet werden. Dabei läßt sich durch größere Studien einerseits die für die Humangenetik interessanten Prozentzahlen von bestimmten X-Chromosomenaberrationen erfassen. Andererseits hat die routinemäßige Reihenuntersuchung einer möglichst großen Population (Screening) den klinischen Nutzen, bei früher Aufdeckung der Anomalien im Neugeborenenalter, rechtzeitig Konsequenzen sozialhygienischer bzw. therapeutischer Art ziehen zu können. Möglicherweise ließen sich so z.B. bei den relativ häufig sozial auffälligen XYY-Probanden (MULDAL, 39, SCHADE, 46) durch frühzeitige Therapie eine bessere soziale Integration erreichen. Neben der Soziotherapie würden in anderen Fällen rechtzeitige chirurgische Maßnahmen oder eine Hormonsubstitution späteren Anpassungsschwierigkeiten vorbeugen (CASEY, 9).

Die vorliegende Arbeit hat zur Aufgabe, Eihäute bzw. Wangenabstriche nach X-Chromatin zu untersuchen, sowie günstige Fixations-, Präparations- und Färbebedingungen zu erarbeiten und eventuelle Gonosomenaberrationen aufzudecken. Insbesondere wurde das Augenmerk auf die Rentabilität und Praktikabilität im Rahmen einer Screeningmethode im heutigen Klinikbetrieb gerichtet.

Die kombinierte Bestimmung von X-Chromatin und Y-Fluoreszenz am gleichen Material läßt bei nur wenig mehr Aufwand den Schluß auf die vollständige Gonosomenkonstellation zu, wobei außerdem durch Vergleich und gegenseitige Kontrolle die Aussagekraft jeder Einzeluntersuchung vergrößert wird.

II Allgemeine Problematik

1. Definition und Theorien des Barrschen Körperchens (X-Chromatin)

Um präzise Aussagen über das Barrsche Körperchen machen zu können, ist eine strenge Definition dessen notwendig. Zur Auswertung sollten nur Zellen gelangen mit intakter Nuklearmembran und unverklumptem, netzigem Chromatin (SCHWARZACHER, 48). Als X-Chromatin soll nur der Anteil des Zellkerns bezeichnet werden, der sich als dicht gefärbte Masse von ca. 1 Mikron im Durchmesser darstellt, die Membran berührt und eine runde, dreieckige oder länglich-ovale Form besitzt (HIENZ, 24). Dabei ist die randständige Lage häufiger zu finden als es der zufälligen Verteilung an der Kernoberfläche entspricht (HINRICHSSEN, 25).

Es gab früher verschiedene Theorien darüber, was das X-Chromatin eigentlich darstellt. Als Erster vertrat 1961 OHNO (40) die Ansicht, daß das Barrsche Körperchen nur einem X-Chromosom entspricht, gleichzeitig unterstützten BARR und CARR (5) diese Arbeitshypothese mit der Behauptung, das X-Chromatin stelle ein einzelnes X-Chromosom dar, das die Eigenschaft der Heteropyknose besitzt.

Laut GROPP (22) verkörpert das X-Chromatin ein vollständiges, heterochromatisches X-Chromosom, während es EBERLE (17) nur für den größeren Anteil dieses einen X-Chromosoms hält.

RAZA ZAIDI (44) ist sogar der Ansicht, daß das Barrsche Körperchen einem Nuklearsatelliten entspricht, der durch Heteropyknose hervorgerufen worden ist, womit er allerdings in der Literatur alleine steht.

Nach der allgemein anerkannten These von LYON (32) wird bei zwei X-Chromosomen eines heterochromisiert (inaktiviert) und erscheint in den Zellkernen als nicht entspiralisierter und gut sichtbarer chromophiler Partikel im Gegensatz zum Euchromatin. LYON vertritt auch die Ansicht, daß die Heterochromisierung dieses einen X-Chromosoms rein zufällig geschieht und dem anderen schon ab einer frühen Entwicklungsphase die genetische Führungsrolle zufällt.

Der BARRschen Methode (4 und 5) liegt also die genetische Inaktivierung eines X-Chromosoms zugrunde, wobei das Heterochromatin einen retardierenden Effekt auf die Dauer des Zellzyklus haben soll, was durch neuere Untersuchungen von BARLOW (3) bestätigt wird.

In der Regel ist jedes X-Chromosom über eines als Geschlechtschromatin färbbar darstellbar - die Anzahl der X-Chromatine entspricht der Anzahl der X-Chromosomen minus eins.

Durch die alleinige Bestimmung des X-Chromatins und ohne Kenntnis zu haben über das Vorhandensein des Y-Chromosoms läßt sich keine vollständige Aussage über das Kerngeschlecht machen. Nur durch vergleichende Untersuchungen über die Y-Fluoreszenz am selben Material ist man in der Lage, die Mehrzahl der Chromosomenaberrationen herauszufinden. Parallel zur vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der Y-Fluoreszenz mit Hilfe der Alehrinfärbung unter dem UV-Mikroskop durch den Kollegen WEGHOFFER (59), der dies in einer weiteren Veröffentlichung darstellt.

2. Untersuchungsmaterialien

Zur Untersuchung auf X-Chromatin bieten sich im Prinzip alle diploiden Zellen des menschlichen Körpers an, da alle Interphasekerne den vollen Chromosomensatz besitzen. So wurden X-Chromatinbestimmungen z.B. an Haarwurzelzellen von ENGEL (17), GODAY (19) und SCHWINGER (49), Nabelschnurzellen von GREENSHER (21), Vaginalepithelien von DEL CAMPO (13) und DÖMÜTRI (14), Leukozyten-"Drumsticks" von MOORHEAD (38) und an durch Amniozentese gewonnenen Fruchtwasserzellen von ADAMS (1) durchgeführt.

Doch sehr früh schon hat sich der Wangenabstrich als leicht verfügbares Untersuchungsmaterial herauskristallisiert, welches ohne größeren Aufwand jederzeit bei beiden Geschlechtern zu gewinnen ist (DÖMÜTRI, 14 und DOUGLAS, 15).

Bei Neugeborenenuntersuchungen bietet sich die Eihaut an, die neben der leichten Verfügbarkeit als "Abfallprodukt" bei der Geburt den Vorteil hat, als Häutchenpräparat ideal auszählbar zu sein und einen hohen Prozentsatz von gut erhaltenen Zellen zu haben.

Zur Verdeutlichung des Schichtenaufbaus des in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendeten Untersuchungsmaterials Eihaut soll folgende Abbildung 1 aus dem Buch von BOURNE (8) dienen.

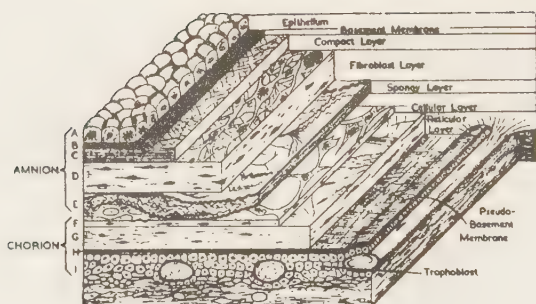


Abb.: 1 aus BOURNE (8)

Diagrammatischer Querschnitt durch die menschliche Eihaut

Bei unserer Arbeit hat sich die oberste Amnionschicht mit dem Bindegewebe als besonders günstig erwiesen. PAULUSSEN und Mitarbeiter (41) vermuten, daß alle Plazentaschichten fetaler Herkunft sind und deshalb sämtlich zur Geschlechtsbestimmung des Neugeborenen geeignet sind außer der Dezidua, der pars materna der Plazenta.

3. Färbungen

BARR (6) und ESKELEND empfahlen Carbolfuchsin zur Darstellung des X-Chromatins bzw. zur Kerngeschlechtsbestimmung. Weitere Verfahren werden von GOLOB (20) mit Kresylviolett, von SMITH (53) mit Orcein, von HIENZ (24) mit Feulgenreaktion, Papanicolaou und Diamantfuchsin, von SCHWINGER (49) mit PAS und mit Biebrich Scarlet und Fast Green (7) angegeben. KLINGER und HAMMOND (27) stellten eine Technik mit Pinacyanol vor, die zwar als etwas zeitsparender, aber nicht so exakt wie die alte KLINGER-Färbung angesehen wird. Die in der vorliegenden Arbeit modifiziert angewendete Färbemethode ist die von KLINGER und LUDWIG (26) 1957 angegebene. Näheres hierzu unter III.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es von ausschlaggebender Bedeutung, immer bei der gleichen Färbung zu bleiben.

III Eigene Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden an einer unausgelesenen Serie von Neugeborenen vorgenommen, die von Anfang Januar 1973 bis Ende Juli 1974 in der I. Frauenklinik der Universität München zur Welt kamen.

Nahezu täglich wurde im Kreißsaal nach Eihäuten soeben stattgehabter Geburten gefrant, wobei die Mitarbeit des Personals unabdingbar war. Da leider aus organisatorischen Gründen auf diese Weise nur ein Bruchteil der Geburten erfaßt werden konnte, versuchten wir durch Miteinsatz von Wannenabstrichen bei Fehlen der Eihaut vom 12. Februar 1974 bis 25. April 1974 eine fortlaufende Serie zu erreichen. In diesem Zeitabschnitt kamen wir immerhin auf fast die Hälfte unseres gesamten Untersuchungsmaterials - im Ganzen 470 Eihäute und 97 Wannenabstriche.

1. Material und Methode

a) Gewinnung des Materials

Nach der Geburt wird die Plazenta im Vorraum des Kreißsaales auf Vollständigkeit geprüft, anschließend schneidet die zuständige Hebamme ein ca. 100 cm^2 großes Stück mit der Schere aus der Eihaut heraus; dieses Stück kommt in ein bereitgestelltes, trockenes Plastikschaubgefäß, welches zur späteren Kontrolle mit Namen und Datum oder Geburtennummer versehen wird und wartet im Kühlschrank auf die Abholung zur Weiterverarbeitung. Eine Eihaut läßt sich bei Kühlschranktemperatur (ca. $+5^{\circ}\text{C}$) gut drei Tage aufbewahren. Der frische Zustand der Eihaut erleichtert jedoch die Auszählung am Mikroskop erheblich und zeitigt bessere Ergebnisse. Im Zytologischen Labor wurde die Eihaut auf einem Holzbrett ausgebreitet und mit der Hand Chorion vom Amnion getrennt (welches mit ein wenig Erfahrung als glattes, durchsichtiges Häutchen leicht vom dickeren, rauhen Chorion zu unterscheiden ist).

Das abgetrennte Amnion wurde mit dem Epithel nach außen auf einen Objektträger gespannt, indem überstehende Teile um die Kanten des Glases gebogen wurden. Evtl. entstehende Luftblasen zwischen Haut und Glas müssen ausgedrückt werden. Die geätzte Fläche des Objektträgers diente der Notierung von Namen und Geburtsdatum mit Bleistift. Durch die anschließende Fixierung in 96% Isopropylalkohol über Stunden bis Tage hielten die Eihäute so fest auf dem Glas, daß sich nur äußerst selten eines bei der Färbung löste.

b) Färbung

Nach mindestens drei Stunden Fixierung in Alkohol bzw. Isopropylalkohol konnten beide Materialien, Eihaut wie Wangenabstrich in gleicher Weise und gleichzeitig den Weg durch die KLINGER-Färbung nehmen. Da diese jedoch recht arbeitsintensiv ist, wäre es empfehlenswert, eine möglichst große Zahl auf einmal in größeren Küvetten zu verarbeiten. Die Xylol-feuchten Objektträger mit dem Wangenabstrich konnten sofort mit Eukitt und einem dünnen Deckglas eingedeckt werden, während die Eihaut vorher mit einer Rasierklinge auf Deckglasformat zurechtgeschnitten und nochmals in Xylol getaucht gehört.

Färbung nach KLINGER (26)

- | | |
|--------------------------|-------------------------------|
| 1. Absoluter Alkohol | min. 20 Minuten |
| 2. 1% Celloidin + Äther | ca. 3 Minuten |
| 3. 70% Alkohol | 10 Minuten |
| 4. 50% Alkohol | durchziehen |
| 5. Aqua dest. | durchziehen |
| 6. Aqua dest. | durchziehen |
| 7. 5n HCL | 20 Minuten |
| 8. Aqua dest. | waschen |
| 9. Aqua dest. | waschen |
| 10. Aqua dest. | waschen |
| 11. Farblösung | 45 Minuten |
| 12. Aqua dest. | waschen |
| 13. 50% Alkohol | waschen |
| 14. 70% Alkohol | } bis keine Farbe mehr abgeht |
| 15. 95% Alkohol | |
| 16. Abs. Alkohol | 3 Minuten |
| 17. Abs. Alkohol | 3 Minuten |
| 18. Xylol | 3 Minuten |
| 19. Xylol | 3 Minuten bis Stunden möglich |
| 20. Eindecken mit Eukitt | |
- 10 Minuten später kann man mikroskopieren

Vor jeder Färbung erneuern:

Celloidin + Äther (2.)
Aqua dest. (5./6.)
Aqua dest. (8./9./10.)
Aqua dest. (12.)

Je nach Zustand erneuern:

Alles übrige

Farblösung (alle 10-14 Tage)

28 ccm Michaelispuffer (9,714g Na-acetat; 14,714 Veronal-Na, H₂O)

32 ccm 0,1n HCL

40 ccm Thioninlösung

100 ccm Küvette

2. Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte unter einem binokularen Lichtmikroskop. Während für die Wangenabstrichbeurteilung die 1000-fache Vergrößerung mit Ölimmersion notwendig war, reichte bei den Eihäuten meist die 400-fache Vergrößerung. Wegen der Größe der Zellen und des besseren Kontrastes zwischen Karyoplasma und Sexchromatin wurde die Bindegewebsschicht mit dem Epithel vorgezogen.

Bei den Eihäuten wurden 100 Kerne mit Hilfe eines Tastenzählwerks ausgezählt - aus verschiedenen Gesichtsfeldern, da öfters Kernfamilien auftraten, die - engbeieinanderliegend - andere Eigenschaften besaßen (z. B. Sexchromatin-negativität bei φ), als die übrigen Kerne. Dies beruht laut SCHWARZACHER und PERA (48) auf der Tatsache, daß die Mutterzelle das Fehlen des Barrschen Körperchens an ihre Tochterzellen weitergibt. Bei den meisten - gut erhaltenen und gefärbten - Eihäuten stand die Geschlechtsdiagnose praktisch schon nach 10 Kernen fest, wegen Mosaik- und Strukturanomalien sollten trotzdem 100 Zellen ausgezählt werden.

Große Schwierigkeiten bereitete jedoch die Auswertung der Wangenabstrichpräparate. Da sich auf einem Objektträger fast nie 100 auszählbare Kerne fanden, mußte die numerische Untersuchung meist an nur 20 bis 50 Kernen vorgenommen werden.

Hauptanliegen unserer Arbeit war die Erstellung einer im Klinikbetrieb praktikablen Methode. Bei der geringen Anzahl von 470 Eihäuten bzw. 97 Wangenabstrichen kann die erarbeitete Statistik nicht als repräsentativ angesehen werden.

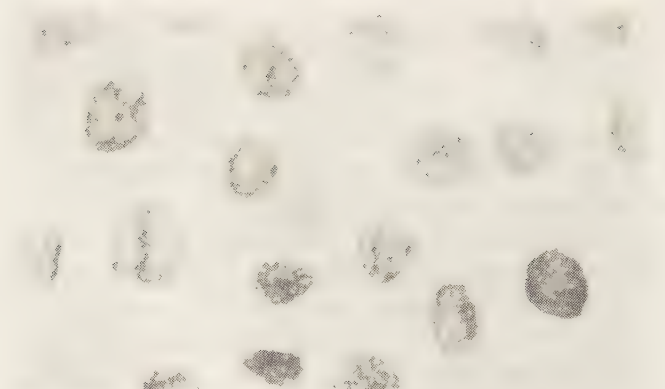


Abb.2: Eihaut - Epithelschicht bei 400-facher Vergr.

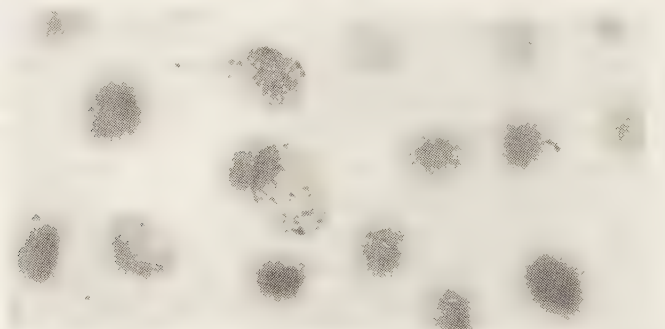


Abb.3: Eihaut - Bindegewebsschicht bei 400-facher Vergr.

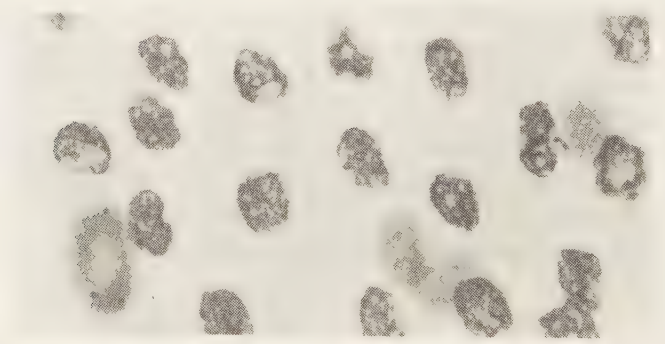


Abb.4: Vaginalabstrich - 1000-fache Vergr. (Ölimmersion)

3. Ergebnisse

a) Geschlechtsbestimmung mit Hilfe des X-Chromatins

	X-Chromatin -				nicht	Summe
	positiv		negativ		auswertbar	
	$\bar{x}$	$\bar{x}$				
EH	235	69,9	223	0,43	12	470
WA	48	23,2	46	3,74	3	97
Summe	283		269		15	567

$\bar{x}$ = Durchschnitt der X-Chromatin-positiven Raten in %.

Tab. 1: Übersicht über das Untersuchungsmaterial

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, haben wir 470 Eihautpräparate (EH) und 97 Wangenabstriche (WA) untersucht.

Bei der Auszählung war der Durchschnitt der 235 X-Chromatin-positiven ($\bar{x}$) Eihautzellen 69,9, die gezählten Werte bewegten sich zwischen 32 und 89, wobei 78% aller X-Chromatin-Raten zwischen 60 und 85 lagen (siehe Abbildung 5).

Die Werte der 223 als männlich interpretierten Eihautpräparate reichten von 0 bis 5 bei einem Durchschnitt von 0,43 - aus Abbildung 5 ist zu entnehmen, daß 92% eine X-Chromatin-Rate von 0 bis 1 hatten.

Von den Wangenabstrichen zählten wir 48 als weiblich; bei einem Durchschnitt der X-Chromatin-Raten von 23,2 reichten die Werte von 10 bis 54%. Da der X-Chromatin-Maximalwert der als männlich interpretierten Wangenabstriche 10% betrug, ist zu bedenken, daß die Unterscheidung zwischen männlichem und weiblichem Kerngeschlecht aus dem Wangenabstrich schwierig sein kann.

Indessen lag der Schwerpunkt der X-Chromatin-Raten von männlichen Wangenabstrichen mit 44 aus der Gesamtzahl 46 unter 8% und der Durchschnitt bei 3,74 (siehe Abbildung 6).

Auf die Ergebnisse und die geringe Signifikanz von X-Chromatin-negativen und X-Chromatin-positiven Wangenabstrichen wird in der Diskussion noch näher eingegangen. Wie oben erwähnt, konnten bei Wangenabstrichen meist nur 20 bis 50 Zellen ausgezählt werden - die Zahlen sind deshalb jeweils auf 100 interpoliert.

Von den 470 Eihäuten waren 12 (2,55%) und von den Wangenabstrichen 3 Präparate (3,1%) nicht auswertbar. Die Ursache dafür ist hauptsächlich in Anfangsschwierigkeiten zu suchen. In sechs Fällen war die Färbung nicht in Ordnung (erneuerungsbedürftig), einmal war das Präparat von dem Objektträger gerutscht wegen schlechter Fixierung, in drei Fällen war das Präparat vor dem Eindecken ausgetrocknet, sodaß Luft unter das Deckglas kam, und in zwei Fällen war das Präparat zu schlecht erhalten (Kernpyknose), weil die Eihaut nicht vorschriftsmäßig im Kühlschrank aufbewahrt worden war.

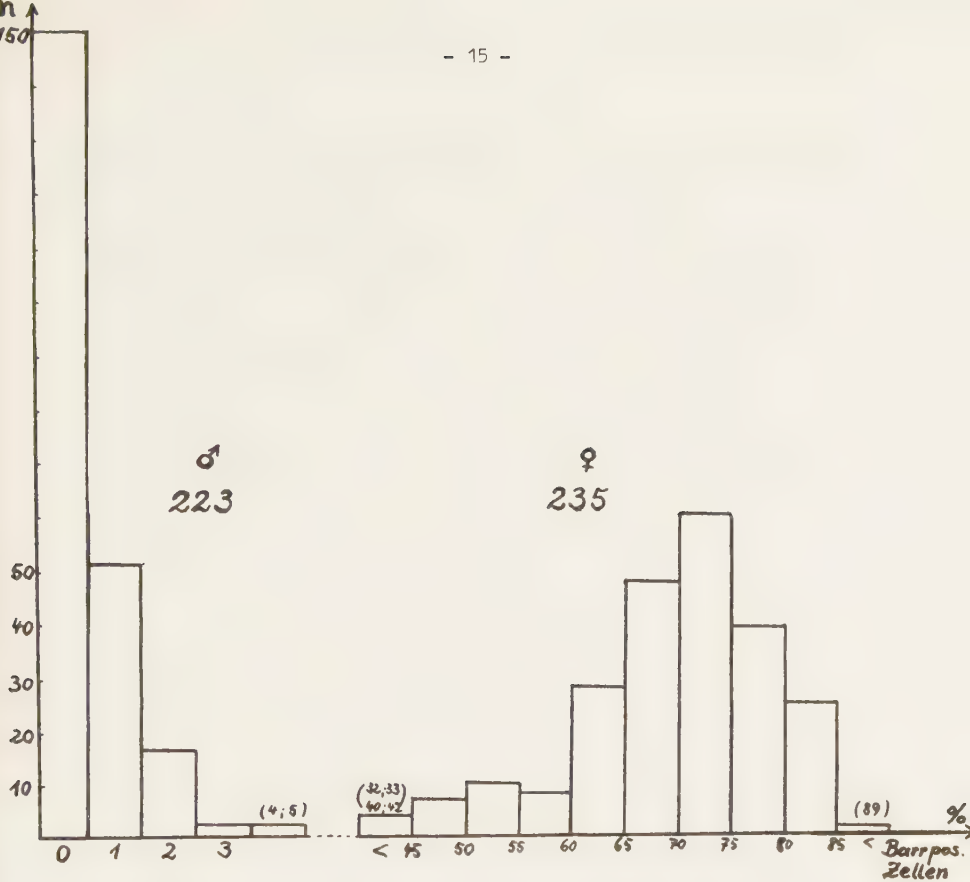


Abb. 5 Barr-Prozentverteilung bei Eihäuten (n = 458)

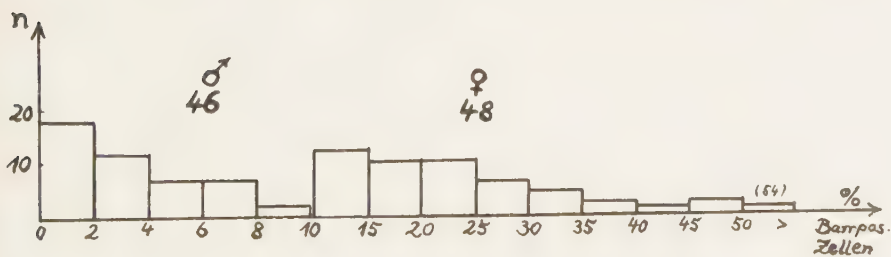


Abb. 6 Barr-Prozentverteilung bei Wangenabstrichen (n = 94)

b) Vergleich der X-Chromatin-Befunde mit dem Ergebnis der Y-Fluoreszenz und klinischen Angaben

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit lag - wie oben erwähnt - im Vergleich mit den Y-Chromatin-Untersuchungen von WEGHOFFER (59) und den klinischen Daten der Probanden.

Nicht nur bei zweifelhaften Ergebnissen, für die oft technische Mängel verantwortlich sind, ist eine Kontrolle angezeigt. Auch ein normaler X-Chromatin-Befund muß durch die Y-Bestimmung ergänzt werden, da es eine Reihe von Chromosomenanomalien gibt, die nur durch die Kombination beider Methoden zu diagnostizieren sind.

So wäre bei einem ULLRICH-TURNER-Syndrom (45/XO) X-Chromatin-negativ und Y-negativ, X-positiv und Y-positiv bei einem KLINEFELTER-Syndrom (47/XXY) zu erwarten (bei normalen Zahlen jedes einzelnen Untersuchers). Eine Anzahl von Barrkörperchen, die zwischen den beiden Normalabweichungen liegt (in unserem Falle zwischen 2 und 45), legt den Verdacht auf eine Mosaikstruktur nahe, falls nicht technische Ursachen (z.B. schlechter Zustand der Eihaut) dies begründen. Barrzahlen über 85 könnten auf ein Genom mit mehr als zwei X-Chromosomen hindeuten, freilich müßten dann auch mehrere Zellen mit mehr als einem X-Chromatin gefunden werden. Ein bis zwei Kerne pro 100 mit 2 X-Chromatin-Körperchen wurden gelegentlich gesehen und sind laut GOLDB (34) nicht als pathologisch anzusehen.

Nach Vorliegen der Ergebnisse über X- und Y-Chromatin erfolgte der Vergleich mit den klinischen Daten der Probanden. Die Kontrolle des phänotypischen Geschlechts im Geburtenbuch schließt das Übersehen eines Pseudohermaphroditismus (z.B. testikuläre Feminisierung, Adrenogenitales Syndrom) aus. Sollten X- und Y-Untersuchungen mit den Angaben im Geburtenbuch nicht übereinstimmen, ist zunächst an einen Schreibfehler zu denken und das tatsächliche Geschlecht durch Untersuchung des Neugeborenen zu verifizieren. Bei unserer Arbeit konnte so einmal eine Diskrepanz geklärt werden.

In allen Fällen, wo zwischen X- und Y-Chromatin-Studie keine Übereinstimmung und Eindeutigkeit zu erzielen waren oder Diskrepanzen zu den klinischen Daten bestanden, sollte eine weitere Klärung des Kerngeschlechts durch die Chromosomenanalyse (Mikromethode nach MOORHEAD, 38) veranlaßt werden.

Da bei unseren Untersuchungen nicht in allen fraglichen Fällen die ganze Arbeitsfolge (Präparation - Fixation - Färbung - Auszählung - Vergleich - Blutkulturanalyse, der nur an zwei Tagen in der Woche durchgeführt wurde) in sieben Tagen Klinikaufenthalt des Neugeborenen möglich war, gelangten wir nur zu sieben Chromosomenanalysen, wovon sechs angingen.

Proband	Barrzahl	Y-Zahl	Geschl. lt. Geb.-Buch	Bemerkung
1. M. 25. 4.	89		♀	höchste X-Zahl 2 Zellen mit 2 Barrs
2. K. 24. 5.	73	85	♀	Chrom. Analyse norm. ♀ (autosomale Fluoresz.)
3. P. 20. 6.	5	0	♂	Chrom. Analyse norm. ♂ (mütterl. Anteile?)
4. S. 3. 9.	0	2+19 "X"	♂	Chrom. Analyse norm. ♂ (Satelliten ?)
5. M. 30.10.	82	76	♀	Chrom. Analyse norm. ♀ (autosomale Fluoresz.)
6. P. 13. 2.	69	79	♀	*
7. G. 13. 3.	54		♀	hohe X-Zahl für WA (Verdacht auf XXX) *
8. P. 15. 3.	75	24	♀	Chrom. Analyse norm. ♀ (autosomale Fluoresz.)
9. N. 20. 3.	69	18	♀	Chrom. Analyse norm. ♀ (autosomale Fluoresz.)
10. D. 25. 4.	32		♀	niedrigste X-Zahl (Chorion?)
11. A. 18. 5.	33		♀	kleine Barrs, multiple Mißbildungen, + p.p. *

* = Chromosomenanalyse zeitlich nicht möglich

Tab. 2: Auswahl der auffälligen Probanden

Von den 11 auffälligen Probanden, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind, wurden in 5 Fällen (Proband 2, 5, 6, 8 und 9) sowohl reichlich x-Chromatin als auch "Y"-Fluoreszenz gesehen, was auch in der Literatur über die Fluoreszenzmethode öfters beschrieben und mit autosomaler Fluoreszenz (d.h. außer den Y-Chromosomen fluoreszieren auch Autosomenanteile) erklärt wird. Die in 4 Fällen durchgeführte Chromosomenanalyse ergab dementsprechend eindeutig weiblich.

Obwohl bei Proband Nr. 3 mit 5% der für männlich höchste Prozentsatz X-Chromatin-positiver Zellen und keine Y-Körperchen gesehen wurden, zeigte sich bei der Chromosomenanalyse ein normales männliches Genom - wahrscheinlich waren mütterliche Eihautanteile zur Färbung gelangt.

Bei Proband Nr. 4 wurde sowohl mit KLINGER-Färbung als auch mit Chromosomenanalyse ein normales männliches Bild diagnostiziert; die bei der Fluoreszenzfärbung irrtümlich als 19 X-Chromatine angesehenen Partikel wurden nach Literaturstudien zu Satelliten abgewertet.

Proband Nr. 1 hatte mit 89% die für Eihaut höchste Anzahl X-positiver Zellen, außerdem wurden 2 Zellen mit je 2 Barrschen Körperchen gesehen.

Proband Nr. 7 wies mit 54% die höchste Anzahl unter den Wangenabstrichen auf - da die Chromosomenanalyse aus Zeitmangel nicht durchgeführt wurde, konnte der Verdacht auf eine XXX-Konstellation weder bestätigt noch widerlegt werden.

Die Probanden Nr. 10 und 11 hatten mit 32 bzw. 33% die niedrigste Anzahl X-positiver Eihautzellen unter den uns weiblich erscheinenden Untersuchten; unsere Beurteilung bestätigte sich im Geburtenbuch.

Einmal (Fall 10) war höchstwahrscheinlich Chorion zur Auswertung gelangt, welches sich bei schlechtem Erhaltungszustand gelegentlich nicht vom Amnion unterscheiden läßt und im Durchschnitt eine niedrigere X-Chromatin-Frequenz aufweist.

In Fall 11 fielen bei der mikroskopischen Untersuchung besonders kleine X-Chromatine auf, das Kind zeigte multiple Mißbildungen und verstarb post partum; eine Chromosomenanalyse konnte nicht durchgeführt werden.

c) Versuche über die Möglichkeit und Dauer einer Konservierung von Eihautpräparaten

Ein anderer Punkt von Interesse war die Frage, wie lange und unter welchen Bedingungen es möglich ist, die Eihaut vor der Verarbeitung (Fixierung) aufzubewahren. Der Versuch einer Konservierung in den üblichen Plastikgefäßen mit Schraubdeckel ohne Hilfsmittel im Kühlfach eines Kühlschranks hat sich bis zu 20 Tagen bewährt. Bedingung war jedoch, daß die Eihaut sofort nach der Gewinnung in niedere Temperaturen gebracht wurde. Will man die tiefgefrorene Eihaut verarbeiten (d.h. auf den Objektträger ziehen), muß sie nur über ein bis zwei Stunden bei Zimmertemperatur aufgetaut werden. Von den 27 eingefrorenen Eihäuten (von jeder wurde sofort ein Kontrollpräparat angefertigt) war nur eine Serie von vier Präparaten schwer auszählbar, weil in der Konservierungszeit der Kühlschrank abgetaut worden war.

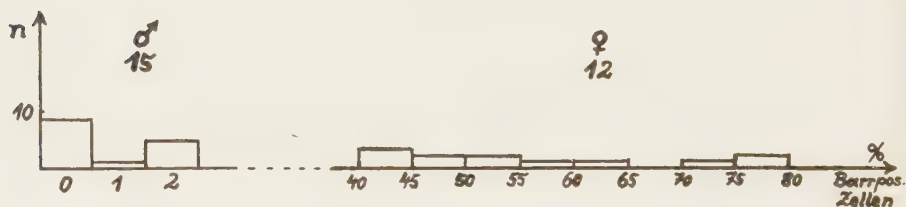


Abb. 7: Barr-Prozentverteilung bei eingefrorenen Eihautpräparaten (n = 27)

Wie aus Abb. 7 und Tab. 3 (Seite 21) ersichtlich, entsprechen die Prozentverteilung und der Durchschnitt an X-Chromatin-positiven Zellen der 27 konservierten Eihäute in etwa den Ergebnissen der sofort ausgewerteten. Der deutliche Abstand der Quote zwischen X-positiv und X-negativ war erhalten; es ergab sich jedoch bei den eingefrorenen X-positiven Präparaten keine Häufung bei 70% (wie in Abb. 5), sondern eine relativ gleichmäßige Verteilung zwischen 40 und 80. Die Durchschnitte der X-Chromatin-Raten waren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 56,08% bei ♀ und 0,79% bei ♂ etwas zusammengedrückt.

Tab. 3: Aufstellung der eingefrorenen Präparate

Name	geb	eingef.	Tage zw Geb/Fix	X- Rate eingf.	Kontr.	Ergebnis
A.	22.4.	22.4.	7	77	75	gut auszählbar
S.	4.6.	6.6.	11	43	68	" "
S.	10.6.	11.6.	15	72	81	" "
H.	13.6.	14.6.	14	50	69	kleine Barrs (Pyknose)
L.	14.6.	14.6.	13	79	72	gut auszählbar
P.	16.6.	18.6.	14	40	(1)	(2)
A.	17.6.	18.6.	13	41	(1)	(2)
B.	22.6.	24.6.	16	47	71	gut auszählbar
K.	20.6.	21.6.	17	52	68	" "
S.	20.6.	20.6.	10	65	70	" "
O.	26.6.	28.6.	11	58	73	Epithelschicht besser
P.	4.7.	7.7.	14	53	73	" gut
P.	29.6.	1.7.	17	52	69	Kerne pyknotisch
S.	9.4.	10.4.	13	2	1	nur stellenw. auszählbar
B.	11.4.	12.4.	11	2	0	nur stellenw. auszählbar
S.	2.5.	3.5.	19	0	0	gut auszählbar
H.	5.5.	6.5.	14	0	0	" "
V.	3.6.	6.6.	12	0	0	" "
W.	6.6.	7.6.	9	2	0	" "
G.	11.6.	11.6.	14	1	0	" "
A.	13.6.	14.6.	11	0	0	" "
H.	16.6.	18.6.	14	1	(1)	" "
N.	20.6.	21.6.	17	0	0	(2)
F.	26.6.	28.6.	11	0	0	gut auszählbar
K.	29.6.	29.6.	16	2	0	" "
P.	1.7.	1.7.	14	0	0	" "
K.	9.7.	9.7.	21	0	0	" "

(1) = Färbung mißlungen

(2) = Auszählung teilweise schwierig, da Material im Kühlschrank aufgetaut

Durchschnitt der Eingefrorenen: ♂ 0,79; ♀ 56,08

Durchschnitt der Kontrolle: ♂ 0,08; ♀ 71,73

IV Diskussion

1. Material

a) Wangenabstrich

Wie im Abschnitt "Allgemeine Problematik" schon angedeutet, empfiehlt sich der Wangenabstrich wegen der leichten Gewinnbarkeit. Die meisten großen Studien über Chromosomenaberrationen wurden deshalb an diesem Material ausgeführt (SMITH, 53; GOLDB, 26; MCLEAN, 34; TAYLOR, 54) und kamen zu einer brauchbaren Aussage über das Kerngeschlecht in Anbetracht des geringen Aufwandes.

SMITH und Mitarbeiter (53) weisen jedoch darauf hin, daß bei weiblichen Neugeborenen bis zu zwei Tagen post partum die Raten an Barrkörperchen sehr niedrig sein können, danach aber auf Zahlen ansteigen, die denen weiblicher Versuchspersonen jeden Alters entsprechen (siehe Abb. 8 und 9).

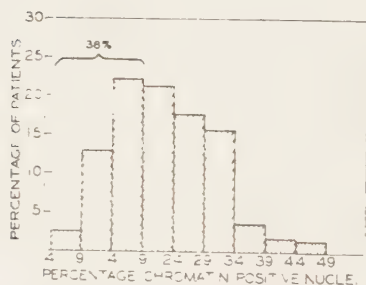


Abb. 8: Prozentverteilung X-Chromatin-positiver Kerne aus WA von 230 Neugeborenen am 1. Lebensstag

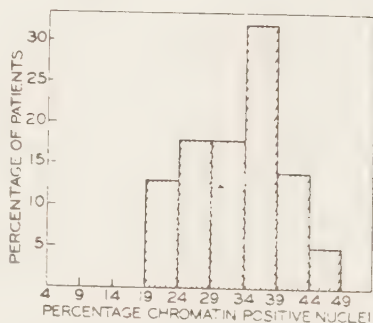


Abb. 9: Prozentverteilung X-Chromatin-positiver Kerne aus WA von 100 weiblichen Probanden zw. 9 Mon. u. 67 J.

Abb. aus SMITH (53)

In der Untersuchung von SMITH wird der parallele und gleichzeitige Verlauf der X-Chromatin-Raten von Neugeborenen und deren Mütter herausgestellt mit dem Minimum am 1. Tag post partum. Dies bestätigen auch die Verlaufsstudien von TAYLOR (54) über die Anzahl von X-Chromatin in 684 Wangenabstrichen, wobei er am 1. Tag p. p. besonders niedrige Zahlen (8,5% bis 20%) und einen Gipfel am 3. Lebenstag fand.

Eine Reihe von Untersuchungen weist auf Schwankungen bzw. niedere Raten von X-Chromatin auch bei Erwachsenen außerhalb der Postpartalzeit bei bestimmten pathologischen bzw. hormonellen Situationen hin. (NNR-Hyperplasie, Hyperthyreose (31), Veränderungen während des weiblichen Zyklus (53)).

LILLIAN und HIRSCHHORN (30) fanden falsch negative Präparate bei nicht lebensfähigen (degenerierten) Zellen. LEVIJ und CAREL (29) sahen in Einzelfällen ein Fehlen des X-Chromatins bei verletzten Zellen und bei Überdeckung durch den Nukleolus. Bei kleinen Zellen ergibt sich relativ häufig eine zentrale Lage des X-Chromatins. Ihrer Meinung nach lasse eine niedrige Zahl von Barrschen Körperchen aber keinen Schluß auf eine Veränderung des Karyotyps zu. Daraus ergibt sich zwangsläufig, daß sich wegen der geringen Signifikanz (53) zwischen X-Chromatin-positiven und -negativen Präparaten Mosaiks kaum aufdecken lassen (DOUGLAS, 15).

KLINGER et al (27) führen eine besonders hohe Anzahl X-positiver Zellen auf Veränderungen in der Kernstruktur der Epithelzellen zurück. Beginnende Degeneration führt zu Kernverkleinerung, wobei einerseits das Barrsche Körperchen schlechter erkennbar ist, andererseits an den Rand gedrängte Chromozentren mit diesen verwechselt werden. Ebenso ergibt sich eine größere Häufigkeit des X-Chromatins durch Kontakthemmung bei höherer Zelldichte, wie dies z. B. bei Zellkulturen der Fall ist.

DOUGHERTY und MC CORMICK (16) hatten wie wir Schwierigkeiten bei ihren Wangenabstrichuntersuchungen: Öfters war der Abstrich nicht auszählbar und mußte deshalb oder wegen Diskrepanz zwischen somatischem und Kerngeschlecht wiederholt werden. Bei ihren 3 875 Fällen ergeben sich 6 Schreibfehler; auch bei unserer Arbeit unterlief ein Übertragungsfehler, indem ein "♀" falsch geschrieben wurde, was zu einer Fehldiagnose geführt hätte - durch Überprüfung des Geschlechts auf Station ergab sich Übereinstimmung zwischen unserer Untersuchung und dem Phänotyp.

Als Ursache für unbefriedigende Abstriche werden unter anderem zu frühe Entnahme angeführt, wobei mütterliche Blutzellen und Zervixschleim, die der Wangenschleimhaut auflagen, die Auswertung störten. Bei älteren Babies erschwerten Bakterien die Untersuchung - hungrige Probanden waren verschleimt und mit offenem Mund schlafende ausgetrocknet. Daraus ergibt sich, daß nur mit Hilfe einer Fachkraft (z.B. Säuglingsschwester), welche sowohl die Kinder kennt als auch die Entnahmetechnik beherrscht, einwandfreie Abstriche zu erwarten sind.

DOUGLAS und BEAVER (15) hatten wie wir Probleme mit Abstrichen, die zu wenig Zellen enthielten. Bei 30% insuffizientem Material empfahlen sie sog. Dakin-Objektträger (eine Oberfläche gefroren).

b) Eihäute

Es folgt nun eine kurze Zusammenstellung von Vorteilen der Eihaut gegenüber dem Wangenabstrich, welche mehrere Untersuchungen (z.B. HARRIS und ROBINSON, 23, die bei 21 214 X-Chromosomenuntersuchungen beide Materialien benutzten) hervorheben:

1. Größere Differenz zwischen X-Chromatin-positiv und - negativ (Signifikanz).
2. Größere Wahrscheinlichkeit der Entdeckung von Aberrationen und Mosaiks.
3. Weitere und indirekte Untersuchungen möglich.
4. Kinder nicht notwendig (Totgeborene, Kranke).
5. Leichte Auszählbarkeit (Häutchenpräparat).
6. Leichtere Handhabung im Klinikbetrieb (für Kinder-schwestern weniger Belastung).
7. Konservierung im Kühlschrank möglich.

Es zeigt sich also, daß die Eihaut besser zur Untersuchung auf X-Chromatin geeignet ist, als der Wangenabstrich. Aufgrund unserer Erfahrungen empfehlen wir die Benutzung des Amnions, da sich diese Schicht wegen ihres Aufbaus, ihres Erhaltungsgrades, ihrer guten Färbbarkeit und der damit verbundenen Auszählbarkeit als ausgezeichnetes Material erwiesen hat. Demgegenüber ist unseres Erachtens das Choriongewebe zu zell dicht und wenig lichtdurchlässig.

Trotzdem fixierte MIKAMO (35) bei seiner 8184-Fall-Studie sämtliche Eihautschichten auf dem Objektträger und ließ sich bei der Auswertung nicht durch Choriongewebe stören. Dabei war das Chorion ersatzweise auch auswertbar, wenn auch weniger verlässlich. Ferner hielt er die kombinierte Auszählung von Wangenabstrichen und Eihäuten für wünschenswert, da das Amnion für Y-Anomalien seiner Ansicht nach eine geringere Signifikanz bietet. Diese Feststellung konnte von WEGHOFFER (59) nicht bestätigt werden.

Wegen degenerativer Veränderungen der Eihäute (Pyknose, Karyolyse, Fettansammlungen) war bei MIKAMO in drei Fällen die Bestimmung nur mit Wangenabstrich möglich. Er behauptet auch entgegen den Untersuchungen von PAULUSSEN (41), daß das Amnion nicht immer repräsentativ für das Kerngeschlecht des Kindes sei, da das Auszählen zu kleiner Regionen zu Fehlurteilen führen kann und stärkere Prozentschwankungen in den verschiedenen Eihautschichten bestehen.

2. Ergebnisse

a) Frequenz von X-Chromatin und Gonosomenaberrationen

Bedingt durch Material und Methode hängt die Frequenz der gezählten X-Chromatine von sehr vielen Variablen ab:

1. Herkunft und Zustand des Materials
2. Konservierung und Färbung
3. Anzahl der gezählten Zellen
4. Angenommene Normwerte
5. Identifikationskriterien (Definition des X-Chromatin)
6. Untersucher (Kernausswahl)

Allgemein ist man der Ansicht, daß die Auszählung von 100 Zellen ausreichend sein müßte. Dies ist auch aus den Untersuchungen von CHU und Mitarbeitern (10) zu ersehen, die dem Problem Nr. 3. mathematisch nachgingen, indem sie 10 Wangenabstriche von weiblichen Probanden auszählten.

Sie kamen bei Zählung von 100 Zellen auf 8 - 60% (σ 23)

300 Zellen auf 8 - 66% (σ 21)

Als Ursache für die breite Spanne werden Grenzfälle ("borderline cells") angeführt, die vom selben Untersucher einmal X-positiv und einmal X-negativ gesehen werden.

An den Wiener Frauenkliniken (GOLDB, 20) erfolgte die Auswertung von 1000 Abstrichen im Blindversuch in zwei verschiedenen Labors - allerdings auch mit verschiedenen Färbungen (Karbolfuchsin und Kresylviolett). Statistisch interessant ist bei der nachfolgenden Tabelle 4 die große Abweichung bei den Fluoreszenzkörperchen.

	Sexchromatin- frequenz in %		F-Körperchen- frequenz in %	
	♂	♀	♂	♀
Lab I	< 1	14 ± 7	16 ± 8	< 1
Lab II	< 1	18 ± 7	59 ± 20	2 ± 1

Tab. 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der X-Chromatin- und Fluoreszenzkörperchen-Frequenz bei Knaben und Mädchen (WA).

In der folgenden Tabelle 5 werden die X-Chromatin-Raten verschiedener Untersucher zusammengefaßt mit Aufstellung der unterschiedlichen Materialien und Färbungen.

Untersucher	Anzahl	Mat	Färbung	♀	%-Zahl	♂
MIKAMO (35)	8184	EH	Orcein	80-95 Epi 70-85 BG	fast	0
HARRIS (23)	1475	WA	Klinger	26+4, <5++		<3
& ROBINSON	19739	EH		≥90+, <5++		≤3
DOUGLAS (15)	257	WA		2-22		0
SMITH (53)	230 ♀	WA	Orcein	4-49		
SEGAL (50)	146 ♂, 93 ♀	WA		20-79		0-4
McLEAN (34)	je 3000 ♀+♂	WA	Barr	36-76		
KLINGER (27)		EH		85-99		0,6-3,4
HIENZ (24)	50	WA EH	PAS	8,7-17,3 85-96,8		0,33-2,33 0,6-3,4
WEIDMANN	450	EH	Klinger	32-89		0-5
	94	WA		10-54		0-10

Tab. 5: Aufstellung verschiedener X-Chromatin-Untersuchungen

Die angeführten Untersucher benutzten verschiedene Färbungen und als Material Eihaut oder Wangenabstrich. Die Prozentzahlen bewegten sich bei weiblichen Eihäuten zwischen 32 und 99, bei männlichen zwischen 0 und 5%.

Bei dem Untersuchungsmaterial Wangenabstrich fiel allgemein eine geringere Signifikanz auf. In unserer Arbeit berührt die Menge der Prozentzahlen, die unter weiblichen Wangenabstrichen gezählt wurden, die Menge der Prozentzahlen "männlich" bei 10, d. h. höchster gefundener Prozentsatz bei ♂ ist gleich dem niedrigsten bei ♀ Wangenabstrichen (Abb. 6).

In der übrigen Literatur aus Tabelle 5 finden sich bei weiblichen Wangenabstrichen Prozentzahlen zwischen 2 und 79 (Durchschnitt 10 - 53%), bei männlichen Wangenabstrichen werden Zahlen zwischen 0 und 4% angegeben.

HARRIS und ROBINSON (23) führen bis zu 5% Zellen mit zwei X-Chromatinen unter den weiblichen Probanden an.

Hinsichtlich der mit X- und Y-Chromatin zu findenden Gonosomenaberrationen sind wir der Ansicht, daß mit unseren 567 Untersuchungen (davon 15 nicht auswertbar) keine Anzahl zu erreichen war, die eine aussagekräftige Statistik ermöglicht. Wir müssen uns deshalb, um Zahlen über die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen angeben zu können, auf größere Erfahrungen in der Literatur berufen.

Bei den in Tabelle 6 (Seite 30) angeführten Studien wurden gelegentlich Mosaikstrukturen (Mos.) entdeckt, d. h. Vorliegen einer normalen Zelllinie neben einer mit abnormen Chromosomensatz im gleichen Individuum. Als Sonderfälle wurden Differenzen zwischen äußerem und Kerngeschlecht und autosomale Fluoreszenz (GOLDB, 20) zitiert. Die unterste Zeile gibt die Häufigkeit verschiedener Gonosomenaberrationen gemittelt wieder, die durchschnittliche Summe aller Auffälligkeiten des Kerngeschlechts betrug 2%.

Beachtenswert ist auch das zeitlich massierte Auftreten von Chromosomenaberrationen. So fand MIKAMO (35) bei 8184 untersuchten Fällen in drei Jahren von März bis Juni keine Aberration und auch HARRIS und ROBINSON (23) weisen auf die selbe jahreszeitliche Abhängigkeit hin, ohne Gründe dafür angeben zu können.

Tab. 6 Zusammenstellung großer Studien über Chromosomenaberrationen

Untersucher	Anzahl	Technik	Gonos. X ₀	Aberr. XX	Aberr. XY	Anzahl der Fälle XXX	Andere	Summe
WALZER (58)	2400 ♀+♂	Chrom. An.		4				4
STEWART (54)	2500 "	"	1 Mos.	3		1	1 XX ♂	6
GOLO B (20)	1000 "	WA		2			1 aut. Fluo	3
LUBS (31)	4500 "		1 0,23	4 0,92	3 0,69	3 0,69		11 2,5
GREENSHER (21)	3472 "	Nabelsch.	1	3	2 0,58		1 XY ♀	9
DOUGHERTY (16)	3875 "	WA (Pap)	1	4+	1 Mos	3	5 Mos + 1 XX ♂	15
MIKAMO (35)	8184 "	EH (Orc)	1	6		3	6 Mos	16
MC LEAN (34)	6000 "	WA (Barr)	1 0,6	5 +4Mos		4		14 2,65
MC LEAN (34)	35809 *		6 0,175	25 0,7		17 0,5		48 1,34
HARRIS (23)	21214 "	WA+EH	3 0,15 7 Mos.	8 0,35 1 Mos.		10 0,5 2 Mos.		31 1,5
HARRIS zit.	63400 "	WA	13 0,13	81 0,75		34 0,3		137 1,3
	42211 "	EH	9 Mos.					
RATCLIFFE (43)	3500 ♂ *			8 0,9			1 XX ♂	9
			0,15	0,75	0,6	0,5		2,0

* mit anderen Studien gemittelt

b) Fehlerquote und Verlässlichkeit

Bei der Interpretation von Aussagen muß man sich über die schwankende Verlässlichkeit des Materials - aufgrund der oft zweifelhaften Qualität und der sich daraus ergebenden geringen Signifikanz - im klaren sein. So bieten die verschiedenen Methoden alle keine 100%ige Treffsicherheit und demzufolge ist die Möglichkeit gegeben, eine Aberration zu übersehen. Auch wegen falsch positiver Bestimmung sind ständige Überprüfung der Ergebnisse und Selbstkritik angezeigt.

So stellten ADAMS und Mitarbeiter (1) bei 49 Amniozentesen zwei Fehldiagnosen des Geschlechts aus den Fruchtwasserzellen.

Bei den Untersuchungen von HARRIS und ROBINSON (23) waren in 95% der Fälle die erste Eihaut lesbar, bei 4% mußte ein zweites EH-Präparat herangezogen werden und 1% war nur durch Wangenabstrich identifizierbar.

DOUGLAS und BEAVER (15) übersahen wegen geringer Signifikanz bei ihren 257 Wangenabstrichen sämtliche 4 Mosaiks, diese konnten nur durch nachträgliche Chromosomenanalysen herausgefunden werden.

GLOB (20) stieß bei seiner Blindstudie in zwei Labors auf statistisch auffällige Differenzen, als deren Ursache die Subjektivität des einzelnen Untersuchers anzusehen ist. Trotzdem gibt er die Treffsicherheit seiner WA-Methode mit 97,0 bis 98,7% an (siehe Tabelle 4, Seite 27).

3. Vorschlag zur Screening-Methode

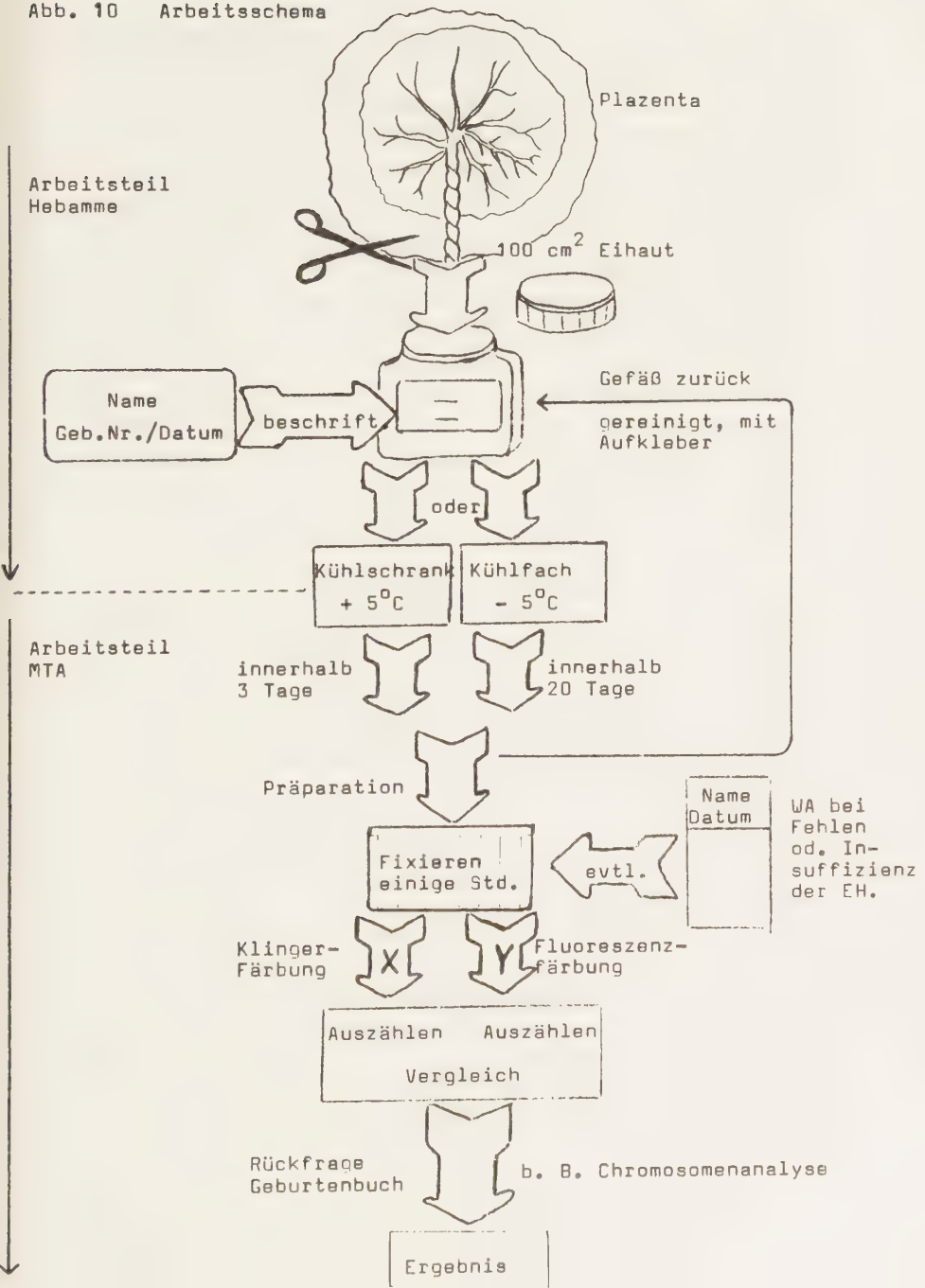
Um eine Untersuchung als Routinemethode geeignet erscheinen zu lassen, müssen neben relativ großer Sicherheit und möglichst geringem finanziellen Aufwand die personellen Möglichkeiten gegeben sein. Um den Arbeitsaufwand auf ein Minimum zu beschränken, muß die Erstellung eines rationellen Arbeitsplanes gefordert werden. Unser Vorschlag, der auf 19-monatiger Erfahrung beruht, geht von den Voraussetzungen der I. Universitätsfrauenklinik München aus, mit einer jährlichen Geburtenrate von ca. 1500 und ist jeweils für andere Häuser den Gegebenheiten anzupassen.

Der Zeitaufwand für die beteiligte Hebamme - bei der Kontrolle der Plazenta ein ca. 100 cm^2 großes Stück Eihaut abzuschneiden und in ein bereitgestelltes Schraubgefäß zu verbringen, dieses mit Namen und Geburtennummer oder -datum zu versehen und in den Kühlschrank zu stellen - ist auf etwa zwei Minuten anzusetzen. Selbstverständlich muß diese Tätigkeit offiziell zum Routineprogramm bei jeder Geburt gehören, um die Vollständigkeit der Screening-Untersuchung zu erreichen.

Es ist günstig, mit dem restlichen Arbeitsgang eine fest angestellte MTA zu betrauen. Diese holt einmal täglich die mit Eihautabschnitten gefüllten Gefäße aus dem Kreißsaal -Kühlschrank, bringt gleichzeitig die gereinigten und mit neuen Aufklebern zur Beschriftung versehenen Gefäße mit und kann gegebenenfalls Informationen aus dem Geburtenbuch entnehmen (Zeitaufwand ca. 20 Minuten).

Die für die Präparation pro Eihaut $\approx$ 2 Präparaten, je 1 für KLINGER- und Fluoreszenzfärbung zu veranschlagende Zeit ist auf etwa 10 Minuten anzusetzen; pro Tag ist im Schnitt mit ca. 4 Eihäuten zu rechnen.

Abb. 10 Arbeitsschema



Zur Färbung der fixierten Eihäute von den Vortagen sollten aus Rationalisierungsgründen immer mindestens acht Präparate gleichzeitig gelangen. Während dieses zwei Stunden dauernden Vorganges können die Lösungen erneuert oder andere Arbeiten eingeplant werden. Das Eindecken von acht Präparaten erfolgt in ca. 20 Minuten. Die Auszählung von 100 Kernen pro Eihaut ist mit einem Tastenzählwerk in ca. fünf Minuten zu bewerkstelligen entsprechend 1/2 Stunde für sechs Präparate. Aus Gründen der Zeitersparnis ist von der breiten Anwendung von Wangenabstrichen abzuraten. DOUGLAS und BEAVER (15) geben - bei Auszählung von 200 Zellen die Auswertungszeit pro Präparat mit fünf Minuten bis zu einer Stunde an (je nach der Beschaffenheit des Abstrichs und Erfahrung des Untersuchers, wobei es sehr ermüdend empfunden wird, die Zellen in einem verstreuten Ausstrich zu suchen).

Sinnvollerweise bearbeitet die selbe Kraft auch den Y-chromosomalen Teil der Färbung und Auswertung im selben Labor, da auf diese Weise unnötige Wege und die zeitraubende Kommunikation vermieden werden.

Zeitaufwand: Färbung (bis 8 Präparate) 25 Minuten

Auswertung pro Präparat 5-10 Minuten

Im 14-tägigen Turnus ist Filtrierung (5 Minuten) bzw. Erneuerung (15 Minuten) der Atebrin-Farblösung notwendig. Der Arbeitsplatz muß am fließenden Wasser installiert werden.

Sollte die Klinger-Färbung aus irgendwelchen Gründen mißlingen, ließe sich neben der Mitverwendung von Wangenabstrichen das fluoreszenzgefärbte und auf Y-Körperchen ausgewertete Präparat mit Klinger nachfärben. Als letzte Möglichkeit zur vollständigen Erfassung bliebe noch die Wiederanbestellung des Patienten zu Wangenabstrich bzw. Blutentnahme für die Chromosomenanalyse.

Insgesamt ist für die Reihenuntersuchung aller in der I. Universitätsfrauenklinik geborenen Kinder auf Sexchromatin und Y-Körperchen und für die gegebenenfalls notwendig werdende Veranlassung einer Chromosomenanalyse wöchentlich etwa 20 Stunden zu veranschlagen. Während eines Urlaubs der MTA (möglichst in einem geburtenschwachen Monat) müßten die anfallenden Eihäute entweder von einer Vertretung oder nachher mit Hilfe der Gefrierkonservierung in Überstunden ausgewertet werden.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 470 Eihäute und 97 Wannenabstriche mittels Klinker-Färbung auf Gonosomenaberrationen untersucht und die Ergebnisse mit einer parallel dazu laufenden Studie über die Fluoreszenzfärbung des Y-Chromosoms am gleichen Material verglichen. Wegen der geringen Anzahl konnten jedoch keine Aberrationen entdeckt werden.

Praktisch wurde mit Erfolg die Konservierung von 27 Eihäuten im Tiefkühlfach bis zu 20 Tagen erprobt.

Im Abschnitt II 'Allgemeine Problematik' wird auf verschiedene Untersuchungsmaterialien, Färbungen und die Theorie des Barrschen Körperchens eingegangen.

Die Diskussion wird anhand der Literatur über große Untersuchungen geführt und deren Ergebnisse in Tabellen zusammengefaßt. Auch Fehlerquoten und -quellen und die Treffsicherheit der Methoden werden diskutiert.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Arbeit lag in der Entwicklung einer Screening-Methode aufgrund der 19-monatigen Erfahrung in der I. Universitätsfrauenklinik München. Eine Halbtagskraft (MTA) ist mit der routinemäßigen Untersuchung auf Barrsche- und Y-Körperchen (bei einer Geburtenrate von 1500 pro Jahr) gut ausgelastet.

Zusammenfassend sei gesagt, daß sich besonders die Eihaut für Routineuntersuchungen auf Geschlechtschromatin und Fluoreszenzkörperchen bei Neugeborenen als ausgezeichnetes Material erwiesen hat.

VI Literaturverzeichnis

- (1) ADAMS, E.: Fetal Sex Determination. *Pediatric Research* 6, 121. 1972
- (2) ARRIGHI, F. E.; HSU, T. C.: Localization of Heterochromatin in Human Chromosomes. *Cytogenetics* 10, 81. 1971
- (3) BARLOW, P. W.: The influence of inactive chromosomes on human development. *Humangenetik* 17, 105. 1973
- (4) BARR, M. L. und BERTRAM, E. G.: Morphological Distinction between Neurons of the male and female and the Behaviour of the nucleolar satellites during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163, 676. 1949
- (5) BARR, M. L. und CARR: Correlations between sexchromatin and sexchromosomes. *Acta genet.* 6, No. 1, 34. 1961
- (6) BARR, M. L.: Sexchromatin techniques. *Human chromosome methodology*. Acad. Press. 1965
- (7) Barr Body Färbung mit Biebrich Scarlet und Fast Green. 3. Tagung der Gesellschaft für gerichtliche Medizin der DDR, Berlin. 1971
- (8) BOURNE, G. L.: The human amnion and chorion, 3 ff. 1962
- (9) CASEY, M. D.; BLANK, C. E.; STREET, D. R. K.; SEGAL, L. J.; MCDUGALL, J. H.; MCGRATH, P. J.; SKINNER, J. L.: YY Chromosomes and antisocial behaviour. *Lancet* II, 859. 1966
- (10) CHU, E.; MALMGREN, R.; KAZAN, E.: Variability of Sexchromatin counts. *Acta Cyt.* 13, No. 2, 72. 1967
- (11) COURT-BROWN, W. M.: Human population cytogenetics. *Frontiers of biology*, No. 5, 192. 1967
- (12) CROME, S. und HABERLANDT, W.: Probleme der klinischen Zytogenetik, insbesondere ihrer Methodik. *Materia Medica Nordmark* 22/5, 249-64. 1970
- (13) DEL CAMPO, M. S. B. und RAMIREZ, O. E. G.: Fluctuations of the sexchromatin during the menstrual cycle. *Inter-society Cytology Council, Inc. Memphis, Tennessee* November 2 - 4. 1970
- (14) DÜMÜTRI, J.: Sexchromatinuntersuchungen von Scheiden- und Mundschleimhautabstrichen. *Zbl. Gynökol.* 86, 1119. 1964

- (15) DOUGLAS, L. und BEAVER, D.: Experience with buccal smears in the General Cytopathology Laboratory. Acta Cyt. 13, No. 10, 595. 1969
- (16) DOUGHERTY, C. und MCCORMICK, M.: X-Chromosomal anomalies in the newborn. Acta Cyt. 17, No. 5, 423. 1970
- (17) EBERLE, P.: Die Chromosomenstruktur des Menschen in Mitosis und Meiosis. G. Fischer Verlag, Stuttgart. 1966
- (18) ENGEL, E.; COLBERSTON, J.C.; MAHLEY, R. W. und FENICHEL, G. M.: Barr body studies from the hair. Lancet I, 789. 1970
- (19) GUDAY, C.; EGOZCUENY, J. und BAFALL, E.: Sexchromatin in hairroot cells. Lancet II, 220. 1971
- (20) GOLOB, E. und WAGENBICHLER, P.: Geschlechtschromatin und Fluoreszenzkörperchen in Mundschleimhautabstrichen von 1000 Neugeborenen. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 33, 8-92. Feb. 1973
- (21) GREENSHER, H. A.; PEAKMAN, D. und ROBINSON, A.: The screening of newborn infants for Y-chromosomal abnormalities - fluorescent staining of umbilical cord cells. Pediatric Research, 6, 357. 1972
- (22) GROPP, H.: Sexchromatin und Chromosomenbefunde. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 7, 691. 1968
- (23) HARRIS, J. und ROBINSON, A.: X-chromosomal abnormalities and the obstetrician. A. J. of Obstetrics, 109, No. 4, 574. 1971
- (24) HIENZ, P.: Die zellkernmorphologische Geschlechtererkennung in Theorie und Praxis. Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, 50 ff. 1959
- (25) HINRICHSSEN, H. und KÜBERLING, F.: Die periphere Lage des Sexchromatins. Acta Anat. 63, 559. 1966
- (26) KLINGER, H. P. und LUDWIG, K.: A universal staining for the sexchromatin body. Stain Techn. 32, 235. 1957
- (27) KLINGER, H. P. und HAMMOND, M. F.: Rapid chromosome and sexchromatin staining with Pinacyanol. Stain Techn. 76, 171. 1971
- (28) KUNIKOWER, G. M.: The philosophy and practice of screening for inherited diseases. Pediatrics, 53, 182-8. Feb. 1974

- (29) LEVIJ, B.; CAREL, G.: Variations in the incidence of sexchromatin. *Acta Cyt.* 12, No. 5, 270. 1967
- (30) LILLIAN und HIRSCHHORN: Low frequency of X-chromatin. *Lancet* I, 385. 1972
- (31) LUBS, H. H. und RUDDLE, F. H.: Chromosomal abnormality in the human population: Estimation of rates on New Haven newborn study. *Science* 169, 495. 1970
- (32) LYON, M. F.: Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature* 198, 372. 1961
- (33) MANNL, R.: Dissertation: Zytogenetische Untersuchungen an einer unausgelesenen Serie von 524 männlichen Neugeborenen. München 1970
- (34) MCLEAN, N.; HARDEN, D. G. und COURT-BROWN, W. M.: Abnormalities of sexchromosome constitution in newborn babies. *Lancet* II, 406. 1961
- (35) MIKAMO, K.: Sexchromosomal anomalies in newborn infants. *Obstetrics and Gyn.* 32, 688, 1968
- (36) MILUNSKY, A.: Sex determining genes and the Y-chromosome. *New England J. of Med.* No. 11, 577. 1973
- (37) MOORE, K. L.: Sex reversal in newborn babies. *Lancet* I, 217. 1959
- (38) MOORHEAD, P. S.; NOWEL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M. und HUNGERFORD, D. A.: Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20, 613. 1960
- (39) MULDAL, S. und OCKEY, C. H.: The "double male": an new chromosome constitution in Klinefelter syndrome. *Lancet* II, 492. 1960
- (40) OHNO, S. und MAKINO, S.: The single-X nature of sexchromatin in man. *Lancet* I, 1213. 1960
- (41) PAULUSSEN, F.; WEITZELL, H. und SCHNEIDER, J.: Fluoreszenz-mikroskopische Kerngeschlechtsbestimmung an der menschlichen Plazenta. *Arch. Gyn.* 214, 311. 1973
- (42) PRADER, G. und v. HARNACK, A.: Schwierigkeit der Geschlechtszuordnung bei der Geburt. *Der Gynäkologe* 4, 193. 1971

- (43) RATCLIFFE, S. G.; STEWART, A. L.; MELVILLE, M. M. und JACOBS, P. A.: Chromosome studies on 3500 newborn male infants. *Lancet* I, 121. 1970
- (44) RAZA ZAIDI, S. S.: Determination of sexchromatin. *Acta Gen. Med.* No. 1, 2, 1972
- (45) ROOK, A.; HSU, L. Y.; GERTNER, M. und HIRSCHHORN, K.: Identification of Y- and X-chromosomes in amniotic fluid cells. *Nature*, 230, 53. 1971
- (46) SCHADE, B.: Dissertation: Chromosomenuntersuchungen an 276 Patienten in psychiatrischen Anstalten. München. 1970
- (47) SCHÜLLER, L.: Methoden zur Darstellung menschlicher Chromosomen und zur zellkernmorphologischen Geschlechtsdiagnose. *Internist*, 4, 542. 1963.
- (48) SCHWARZACHER, H. G. und PERA, F.: Das Problem der Sex-Chromatin-negativen Zellen. *Zweite Anat. Entw. Gesch.* 132, 18-33. 1970
- (49) SCHWINGER, E. und SPERLING: Barrkörperchen aus Haarwurzelzellkernen nach Fluoreszenz- und Diamantfuchsinfärbung. *Humanogenetik* 18, 181. 1973
- (50) SEGAL, S. J. und NELSON, W. D.: Developmental aspects of human hermaphroditism: The significance of sexchromatin patterns. *J. Clin. Endocrin.* 17, 676. 1957
- (51) SERGOVICH, F. und VALENTINE, G. H.: Chromosome aberrations in 2159 consecutive newborn babies. *New England J. Med.* 280, 851. 1969
- (52) SERVY, E., BYRD, J. R. und GREENBLATT, R. B.: Cytogénétique et ambiguïté sexuelle. *Bord. Med.* 1775-81, Passim. Oct 1972.
- (53) SMITH, D.; MARDEN, P.; McDONALD, H. und SPECKHARD, M.: Lower incidence of sexchromatin in buccal smears of newborn babies *Pediatrics*, 30, 707. 1962
- (54) STEWART, A.; KEAY, A. J.; JACOBS, P. und MELVILLE, M.: A chromosome survey of unselected liveborn children with congenital abnormalities. *J. of Ped.* 3, 449-58. 1974
- (55) TAYLOR, A.: Low incidence of X-Chromatin. *Personal communication. Lancet* II, 408. 1961
- (56) TAYLOR, A.: Sexchromatin in newborn. *Lancet* I, 912, 1963

- (57) THERMAN, E. und PÄTAU, K.: Abnormal X-chromosomes in man: Origin, behaviour and effects. Humangenetik 25, 1-16. 1974.
- (58) WALZER, S.; BREAU, G. und GERALD, P. S.: A chromosome survey of 2400 normal newborn infants. H. Pediat. 74, 438, 1969
- (59) WEGHOFFER, H.: Dissertation: Zytogenetische Untersuchungen an 567 Eihäuten und Wangenabstrichen von Neugeborenen mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung. München, 1977

An dieser Stelle danke ich Herrn Dr. Baur für die Überlassung des Themas, die ausführliche Diskussion der Ergebnisse und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Zander gilt der Dank für die Möglichkeit, meine Arbeit in der 1. Frauenklinik der Universität München durchführen zu können.

Den Mitarbeiterinnen in Kreißsaal und zytologischem Labor danke ich für die freundliche Hilfe.

Lebenslauf

Am 28. November 1949 wurde ich, Gilbert Weidmann, in Augsburg als Sohn des Exportkaufmanns Theodor Weidmann und seiner Ehefrau Irma geboren.

Nach dem Besuch von Volksschule und Gymnasium in Füssen legte ich 1969 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich mich an der Universität München, wo ich im Juni 1975 das Medizinstudium mit dem Staatsexamen beendete.

Als Medizinalassistent war ich in der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Schwabmünchen und in der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Füssen tätig.

Von Februar 1977 bis Mai 1978 diente ich als Truppenarzt in Donauwörth.

Vom Juni 1978 bis Dezember 1979 war ich als Assistenzarzt auf der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Füssen beschäftigt.

Seit Januar 1980 vertrete ich einen Kollegen in einer Landarztpraxis in Altusried/Oberallgäu. Die Übernahme erfolgt zum 1. Juli 1980.

